

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年1月11日 (11.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/02585 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/55, 1/21, 9/14

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04285

(22) 国際出願日: 2000年6月28日 (28.06.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/189644 1999年7月2日 (02.07.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 藤沢
薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8514 大阪府大阪市中央区道
修町3丁目4番7号 Osaka (JP).

種区松竹町1-38 プリオール牧野3B Aichi (JP). 野口祐
嗣 (NOGUCHI, Yuji) [JP/JP]; 〒490-1114 愛知県海部
郡菰田寺町大字下菰津字五反田31-1 Aichi (JP). 山下
道雄 (YAMASHITA, Michio) [JP/JP]; 〒305-0044 茨城
県つくば市並木3-11-11 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒541-0046
大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 湯木ビル
Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, CN, JP, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 柴田 孝 (SHI-
BATA, Takashi) [JP/JP]; 〒464-0823 愛知県名古屋市中

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE ENCODING CYCLIC LIPOPEPTIDE ACYLASE AND EXPRESSION OF THE SAME

(54) 発明の名称: 環状リポペプチドアシラーゼをコードする遺伝子およびその発現

(57) Abstract: Determination of the base sequence in the coding domain of a cyclic lipopeptide acylase; determination of the full amino acid sequence of this acylase; an expression vector containing a gene encoding the above enzyme; and a process for producing the cyclic lipopeptide acylase by expressing the above expression vector in a host cell. Use of a transformant, which has an activity comparable to acylase obtained by culturing a conventional cyclic lipopeptide acylase-producing strain and has been constructed genetic engineeringly, makes it possible to shorten the culture time (i.e., the time for producing acylase).

(57) 要約:

本発明は、環状リポペプチドアシラーゼのコード領域の塩基配列の決定、および当該アシラーゼの全アミノ酸配列の決定、当該酵素をコードする遺伝子を含む発現ベクター、および当該発現ベクターを宿主細胞内で発現させることによる環状リポペプチドアシラーゼの製造方法の提供に関する。本発明によれば、従来の環状リポペプチドアシラーゼ生産菌を培養して得られるアシラーゼと同等の活性を有し、且つ遺伝子工学的に作製した形質転換体を使用することにより、その培養にかかる時間（すなわちアシラーゼ生産にかかる時間）を短縮することが可能となった。

WO 01/02585 A1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

明細書

環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子およびその発現

技術分野

本発明は、環状リボペプチド物質のアシル側鎖を脱アシル化する酵素（以下環
5 状リボペプチドアシラーゼともいう）、それをコードする遺伝子、該遺伝子を用
いた遺伝子操作による環状リボペプチドアシラーゼの製造方法および環状リボペ
プチド物質のアシル側鎖を脱アシル化する方法に関する。

背景技術

環状リボペプチド物質、例えばFR 9 0 1 3 7 9 物質およびその類似体のアシ
10 ル側鎖を脱アシル化する酵素としては、ストレプトマイセス属に属する細菌（例
えば *Streptomyces anulatus* No.4811 株、*Streptomyces anulatus* No.8703 株、
Streptomyces sp. No.6907 株）が生産する酵素が報告されている（WO 9 7 /
3 2 9 7 5 号公報）。さらに、WO 9 7 / 4 7 7 3 8 号公報には、*Oidiodendron*
tenuissimum IF0 6798 株、*Oidiodendron echinulatum* IF0 31963 株、
15 *Oidiodendron truncatum* IF0 9951 株、*Oidiodendron truncatum* IF0 31812 株、
Oidiodendron sp. No.30084 株、*Verticillium* sp. No.30085 株が生産する酵素
が報告されている。

当該酵素の大量生産、あるいは生産時間の短縮化が求められていた。

発明の開示

20 本発明は、環状リボペプチドアシラーゼをより効率良く採取することを目的と
する。より具体的には本発明は、当該環状リボペプチドアシラーゼのアミノ酸配
列の決定、それをコードする遺伝子の決定、ならびに該遺伝子を用いた遺伝子操
作による当該酵素の製造方法および環状リボペプチド物質のアシル側鎖を脱アシ
ル化する方法の提供を目的とする。

25 本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究を重ねた結果、環状リボペ
プチドアシラーゼのコード領域をクローニングすることに成功し本発明を完成し
た。さらに本発明者らは該DNAを含む発現ベクターを宿主細胞に導入し、当該

環状リボペプチドアシラーゼ活性を発現させた。

すなわち本発明は以下の通りである。

(1) 以下の(a)、(b)または(c)の全部または一部を含む、環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子。

5 (a)配列表配列番号 1 で示される塩基配列からなる DNA

(b)上記(a)の DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る DNA

(c)配列表配列番号 1 で示される塩基配列において少なくとも(1)60%の同一性、(2)70%の同一性、(3)80%の同一性、(4)90%の同一性、または(5)95%の同一性を有する DNA

10 (2) 以下の(a)または(b)のタンパク質またはその一部をコードする遺伝子。

(a)配列表配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ環状リボペプチドアシラーゼ活性を有するタンパク質

15 (3) 上記(1)または(2)記載の遺伝子を含む組換えベクター。

(4) 上記(1)または(2)記載の遺伝子を機能的に含む発現ベクター。

(5) 上記(3)または(4)記載のベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

20 (6) 上記(4)記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から、環状リボペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基をアミノ基へと脱アシル化する反応を触媒し得る環状リボペプチドアシラーゼを採取することを含む該環状リボペプチドアシラーゼの製造方法。

(7) 上記(6)記載の製造方法によって製造される環状リボペプチドアシラーゼ。

25 (8) 以下の(a)、(b)または(c)の全部または一部を含む、環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子。

(a)配列表配列番号 1 に示される塩基配列中塩基番号 1065～3359 で示さ

れる塩基配列からなるDNA

(b)上記(a)のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし得るDNA

(c)配列表配列番号1に示される塩基配列中塩基番号1065～3359で示される塩基配列において少なくとも(1)60%の同一性、(2)70%の同一性、(3)

5 80%の同一性、(4)90%の同一性、または(5)95%の同一性を有するDNA
(9)以下の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a)配列表配列番号2で示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1または1～765からなるタンパク質

(b)アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付
10 加されたアミノ酸配列からなり、且つ環状リボペプチドアシラーゼ活性を有する
タンパク質

(10)上記(8)または(9)記載の遺伝子を含む組換えベクター。

(11)上記(8)または(9)記載の遺伝子を機能的に含む発現ベクター。

(12)上記(10)または(11)記載のベクターで宿主細胞を形質転換して
15 得られる形質転換体。

(13)上記(11)記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で
培養し、得られる培養物から、環状リボペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基を
アミノ基へと脱アシル化する反応を触媒し得る環状リボペプチドアシラーゼを採
取することを含む該環状リボペプチドアシラーゼの製造方法。

20 (14)上記(13)記載の製造方法によって製造される環状リボペプチド
アシラーゼ。

(15)配列表配列番号1に示される塩基配列中塩基番号1065～3359で
示される塩基配列からなるDNAがコードする環状リボペプチドアシラーゼ。

(16)配列表配列番号1に示される塩基配列中塩基番号1065～3359で
25 示される塩基配列において少なくとも(1)60%の同一性、(2)70%の同一性、
(3)80%の同一性、(4)90%の同一性、または(5)95%の同一性を有するD
NAがコードする環状リボペプチドアシラーゼ。

(17) 以下の(a)または(b)のタンパク質。

(a)配列表配列番号2に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1または1～200のアミノ酸配列からなるタンパク質

5 (b)上記(a)のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ下記(18)記載のタンパク質と複合体を形成して環状リボペプチドアシラーゼ活性を示すタンパク質

(18) 以下の(c)または(d)のタンパク質

(c)配列表配列番号2に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号201～765のアミノ酸配列からなるタンパク質

10 (d)上記(c)のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ上記(17)記載のタンパク質と複合体を形成して環状リボペプチドアシラーゼ活性を示すタンパク質

(19) 上記(17)記載のタンパク質をコードするDNA

(20) 上記(18)記載のタンパク質をコードするDNA

15 (21) 上記(19)および(20)の少なくとも一方を含む組換えベクター。

(22) 上記(19)および(20)の少なくとも一方を含む発現ベクター。

(23) 上記(21)または(22)記載のベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

20 (24) 上記(22)記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から、環状リボペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基をアミノ基へと脱アシル化する反応を触媒し得る環状リボペプチドアシラーゼを採取することを含む該環状リボペプチドアシラーゼの製造方法。

(25) 上記(24)記載の製造方法によって製造される環状リボペプチドアシラーゼ。

25 (26) 上記(4)、(11)、(22)記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に環状リボペプチド物質を接触させる工程を含む、環状リボペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基

をアミノ基へと脱アシル化する方法。

図面の簡単な説明

図1は、環状リボペプチドアシラーゼ小サブユニットの一部のN末端アミノ酸配列を決定した結果を示す図である。

- 5 図2は、環状リボペプチドアシラーゼ大サブユニットの一部のN末端アミノ酸配列を決定した結果を示す図である。

図3は、ストレプトマイセス・リビダンス 1326/pIJ702-SB の遺伝子地図である。

発明の詳細な説明

- 本発明において、環状リボペプチドアシラーゼとは、例えば F R 9 0 1 3 7 9
- 10 物質及びその類似体、あるいは echinocandin B のような類縁体のアシル側鎖を脱アシル化する酵素である。

本発明の環状リボペプチドアシラーゼは大小2つのサブユニットからなり、各サブユニットはそれぞれ以下の特徴を有する。各サブユニットは複合体を形成して、当該環状リボペプチドアシラーゼ活性を示す。

- 15 大サブユニット：

①分子量：約 6 1 k D a (S D S - P A G E)

②アミノ酸分析：

- N末端アミノ酸配列が、Ser-Asn-Ala-Val-Ala-Phe-Asp-Gly-Ser-Thr-Thr-Val-Asn-Gly-Arg-Gly-Leu-Leu-Leu-Gly (配列表配列番号3) または該アミノ酸配列
- 20 において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列である。

- ③配列表配列番号1に示される塩基配列中塩基番号1665～3359で示される塩基配列からなるDNAまたは当該DNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし得るDNA、若しくは当該塩基配列において少なくとも(1)60%の
- 25 同一性、(2)70%の同一性、(3)80%の同一性、(4)90%の同一性、または(5)95%の同一性を有するDNAがコードするタンパク質。

④配列表配列番号2に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号201～765のア

ミノ酸配列からなるタンパク質、若しくは当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ下記小サブユニットと複合体を形成して環状リボペプチドアシラーゼ活性を示すタンパク質。

5 小サブユニット：

①分子量：約19kDa (SDS-PAGE)

②アミノ酸分析：

N末端アミノ酸配列が、Gly-Ser-Gly-Leu-Ser-Ala-Val-Ile-Arg-Tyr-Thr-Glu-Tyr-Gly-Ile-Pro-His-Ile-Val-Ala (配列表配列番号4) または該アミノ酸配列

10 において1個もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列

③配列表配列番号1に示される塩基配列中塩基番号1065～1664で示される塩基配列からなるDNAまたは当該DNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし得るDNA、若しくは当該塩基配列において少なくとも(1)60%の
15 同一性、(2)70%の同一性、(3)80%の同一性、(4)90%の同一性、または(5)95%の同一性を有するDNAがコードするタンパク質。

④配列表配列番号2に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1または1～200のアミノ酸配列からなるタンパク質、若しくは当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、
20 且つ上記大サブユニットと複合体を形成して環状リボペプチドアシラーゼ活性を示すタンパク質。

本発明の環状リボペプチドアシラーゼは、上記の特徴を有する限りその由来に特に限定はなく、天然に存在する生物起源のもの他、自然もしくは人工の突然変異体、あるいは変種、すなわち外来の環状リボペプチドアシラーゼ遺伝子を導
25 入して得られる形質転換体由来のものも全て包含される。

人工的に突然変異体を作製する方法としては、例えば、部位特異的突然変異誘発が挙げられる。より具体的には当該方法を用いて配列表配列番号1に示される

塩基配列に任意の変異をもたらすことにより、変異環状リボペプチドアシラーゼを得ることができる。かくして得られる変異環状リボペプチドアシラーゼは、上記特徴を具備している。

本発明の環状リボペプチドアシラーゼは、(1)該酵素を産生する細胞または組織の培養物を原料として単離精製する方法、(2)化学的に合成する方法または(3)遺伝子組換え技術等により環状リボペプチドアシラーゼを発現するように操作された細胞から精製する方法等の公知手法を適宜用いることによって取得することができる。

本発明の環状リボペプチドアシラーゼの単離精製は、例えば以下のようにして行なうことができる。すなわち適当な液体培地中で、環状リボペプチドアシラーゼを発現している細胞を培養し、得られる培養物から公知の方法で抽出、精製される。当該抽出、精製の方法は目的生成物の存在する画分に応じて適宜公知の手法が用いられる。

具体的には次のようにして行なわれる。まず、培養物をそのまま濾過又は遠心分離等の常法に付して細胞又は上清を回収する。細胞中に該酵素が蓄積されている場合には、当該回収した細胞を適当な緩衝液剤中に懸濁して、さらに界面活性剤を適当な濃度で加えて膜を可溶化する。宿主細胞が細胞壁を有する場合、リゾチームや超音波による前処理が必要である。界面活性剤としてはドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド (CTAB) 等が挙げられるが、これらは強力なタンパク質変性作用を有するので、タンパク質が生物活性を持つように折り畳まれるためには、例えば Triton X-100 等の穏やかな非イオン性界面活性剤を用いることが好ましい。次いで得られる粗抽出液を、必要ならば界面活性剤の存在下で、一般に用いられる方法を適宜組み合わせることによって該酵素を単離精製する。

該酵素が培養培地中に存在する場合には、まず培養物を濾過又は遠心分離に付して沈澱物（細胞等の固形物）を除去することにより、溶液部分のみを得、それを一般に用いられる方法を適宜組み合わせることによって目的物質を単離精製す

- る。塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE等の分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動等の等電点の差を利用する方法等が挙げられる。より具体的には、例えば、減圧濃縮、凍結乾燥、常用の溶媒による抽出、pH調整、陰イオン交換樹脂または陽イオン交換樹脂、非イオン性吸着樹脂等の常用の吸着剤による処理、結晶化、再結晶化等の慣用の方法によって分離、精製することができるが、具体的にはWO 97/32975号公報記載の方法を参照とすればよい。
- 5 方法、等電点電気泳動等の等電点の差を利用する方法等が挙げられる。より具体的には、例えば、減圧濃縮、凍結乾燥、常用の溶媒による抽出、pH調整、陰イオン交換樹脂または陽イオン交換樹脂、非イオン性吸着樹脂等の常用の吸着剤による処理、結晶化、再結晶化等の慣用の方法によって分離、精製することができるが、具体的にはWO 97/32975号公報記載の方法を参照とすればよい。
- 10 化学合成による本発明の環状リボペプチドアシラーゼの製造は、例えば配列表配列番号1に示される塩基配列を基にして、該配列の全部または一部がコードするアミノ酸を特定し、該アミノ酸をペプチド合成機を用いて合成あるいは半合成することにより行なうことができる。
- 環状リボペプチドアシラーゼ遺伝子のクローニングは、通常以下の方法により
- 15 行なわれる。まず、環状リボペプチドアシラーゼを産生する細胞または組織より、通常の方法に従って該酵素を完全または部分精製し、大サブユニットおよび小サブユニットそれぞれのN末端アミノ酸配列をエドマン法により決定する。また、各サブユニットを配列特異的プロテアーゼで部分分解して得られるオリゴペプチドのアミノ酸配列を同様にエドマン法により決定する。決定された部分アミノ酸
- 20 配列に対応する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーまたはプローブとして用いて、環状リボペプチドアシラーゼを産生する細胞または組織より調製されたRNAまたはDNAからPCR法またはコロニー（もしくはブランク）ハイブリダイゼーション法によって各サブユニットをクローニングする。
- 25 得られた各サブユニットの塩基配列をもとにしてオリゴヌクレオチドを合成し、これをプライマーとして用いて、再度環状リボペプチドアシラーゼを産生する細胞または組織より調製されたRNAまたはDNAからPCR法またはコロニー

(もしくはブランク) ハイブリダイゼーション法を繰り返して環状リボペプチドアシラーゼをクローニングする。

あるいは、完全または部分精製された環状リボペプチドアシラーゼの全部または一部を抗原として該酵素またはそのサブユニットに対する抗体を常法に従って作製し、環状リボペプチドアシラーゼを産生する細胞または組織より調製されたcDNAまたはゲノミックDNAライブラリーから、抗体スクリーニングにより該酵素および／または該酵素のサブユニットをコードするDNAをクローニングすることもできる。

さらに、上述の方法とは別に、本発明の環状リボペプチドアシラーゼをコードするDNAは、PCR法を用いて直接クローニングすることもできる。すなわち、該酵素活性を有する細胞または組織由来のゲノミックDNAまたはcDNA（もしくはmRNA）を鋳型とし、増幅断片が環状リボペプチドアシラーゼのコード領域、大サブユニットのコード領域、もしくは小サブユニットのコード領域をカバーするような適当なオリゴヌクレオチドの対をプライマーとして用いて、常法に従ってPCRを行なうことにより当該酵素のコード領域、大サブユニットのコード領域もしくは小サブユニットのコード領域を含むDNA断片を増幅することができる。

得られたDNAインサートの塩基配列は、マキシム・ギルバート法やジデオキシターミネーション法等の公知のシーケンス技術を用いて決定することができる。

本発明の環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子は、配列表配列番号1に示される塩基配列から実質的になるDNAの、全部または一部を含むものである。ここで「実質的になるDNA」とは、上記特定の塩基配列からなるDNAに加えて、ストリンジェントな条件（本発明では、塩基配列において約60%以上の相同性を有するDNAがハイブリダイズし得る条件をいい、ストリンジェンシーはハイブリダイズ反応や洗浄の際の温度、塩濃度等を適宜変化させることにより調節することができる）において、上記の特定塩基配列からなるDNAとハ

イブリダイズし得る塩基配列からなるDNA、若しくは配列表配列番号1で示される塩基配列において少なくとも(1)60%の同一性、(2)70%の同一性、(3)80%の同一性、(4)90%の同一性、または(5)95%の同一性を有するDNAを意味する。当該遺伝子がコードする環状リボペプチドアシラーゼは、例えばFR901379物質及びその類似体、あるいは echinocandin B のような類縁体のアシル側鎖を脱アシル化することができ、且つ各サブユニットは上述の理化学的性質を有する。

本発明の環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子の別の態様は、配列表配列番号1に示される塩基配列中塩基番号1065～3359で示される塩基配列から実質的になるDNAの、全部または一部を含むものである。ここで「実質的になるDNA」とは上述のとおりである。

さらに本発明は、以下の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子を提供する。

(a)配列表配列番号2で示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1または1～765からなるタンパク質

(b)アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ環状リボペプチドアシラーゼ活性を有するタンパク質

また、本発明は上記環状リボペプチドアシラーゼの大サブユニットならびに小サブユニットをコードする遺伝子を提供する。

本発明の遺伝子はいかなる方法で得られるものであってもよい。例えば、mRNAから調製される相補DNA(cDNA)、ゲノミックライブラリーから調製されるゲノミックDNA、化学的に合成されるDNA、RNA又はDNAを鋳型としてPCR法により増幅させて得られるDNA及びこれらの方法を適当に組み合わせるDNA等が含まれる。

本発明はまた、上記のいずれかの遺伝子を含有する組換えベクターに関する。本発明の組み換えベクターは、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主内

で複製保持または自律増殖できるものであれば特に限定されず、プラスミドベクターおよびファージベクター等が包含される。当該組換えベクターは、簡便には当分野において入手可能なクローニングベクターまたは発現ベクターに上記のいずれかのDNAを適当な制限酵素部位を利用して挿入することによって調製することができる。

特に、本発明の組換えベクターは環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子を機能的に含む発現ベクターである。ここで「機能的に」とは、そのベクターに適合する宿主細胞内で該遺伝子（DNA）が転写され、それにコードされるタンパク質が産生され得るように該遺伝子が配置されていることを意味する。好ましくは、プロモーター領域、開始コドン、環状リボペプチドアシラーゼまたはその各サブユニットをコードする遺伝子、終止コドンおよびターミネーター領域が連続的に配列された発現カセットを有するベクターである。用いられる発現ベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種宿主細胞内で機能して、その下流に配置された遺伝子を発現させ得るプロモーター領域と、該遺伝子の転写を終結させるシグナル、すなわちターミネーター領域を含有し、該プロモーター領域と該ターミネーター領域とが少なくとも1つのユニークな制限酵素認識部位を含む配列を介して連結されたものであれば特に制限はないが、形質転換体選択のための選択マーカー遺伝子をさらに含有していることが好ましい。さらに所望により、該発現ベクターは開始コドンおよび終止コドンを、それぞれプロモーター領域の下流およびターミネーター領域の上流に含んでもよい。

環状リボペプチドアシラーゼの大サブユニット（あるいは小サブユニット）をコードする遺伝子を含む発現ベクターを環状リボペプチドアシラーゼの製造の為に使用する場合には、当該DNAに加えて、小サブユニット（あるいは大サブユニット）をコードするDNAを宿主細胞内で発現し得る形態で含有する発現ベクターを用いる。大サブユニットをコードするDNA、小サブユニットをコードするDNAはそれぞれ別のプロモーターの制御下に置かれていても良く、あるいは同一のプロモーターの制御下にタンデムに配置されていてもよい。

取得を目的として環状リボペプチドアシラーゼを培地中へ分泌させるためには本発明の発現ベクターはシグナル配列を機能的に含有していることが好ましい。当該シグナル配列は宿主細胞のタンパク質の分泌機構が認識できるものであれば特に限定されないが、宿主細胞が放線菌の場合、本発明の環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子とその由来を同じくするストレプトマイセス属のものが好ましい。該シグナル配列は細胞内のプロテアーゼにより切断除去されて成熟タンパク質が細胞外に分泌される。

宿主細胞として細菌を用いる場合、一般に発現ベクターは上記のプロモーター領域およびターミネーター領域に加えて宿主細胞内で自律複製し得る複製可能単位を含む必要がある。プロモーター領域には、プロモーター、オペレーターおよび Shine-Dalgarno (SD) 配列が含まれる。例えば、宿主が大腸菌の場合には、プロモーター領域として Trp プロモーター、lac プロモーター、recA プロモーター、lpp プロモーター、tac プロモーター等が、また、宿主が枯草菌の場合には、プロモーター領域として SPO1 プロモーター、SPO2 プロモーター、penP プロモーター等が、宿主が放線菌の場合には、melC、tipA、ermE、aphI 等が挙げられる。ターミネーター領域としては、通常使用されている天然または合成のターミネーターを用いることができる。また、選択マーカー遺伝子としては、テトラサイクリン、アンピシリン、カナマイシン、チオストレプトン等の各種薬剤に対する耐性遺伝子を用いることができる。開始コドンとしては通常 ATG が用いられるが、場合によって GTG を使用することもできる。終止コドンとしては常用の TGA、TAA および TAG が用いられる。

本発明の環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子が該酵素を産生する細胞または組織由来のゲノミック DNA から調製され、本来のプロモーターおよびターミネーター領域を含有する形態で得られる場合には、本発明の発現ベクターは、形質転換しようとする宿主細胞内で複製保持または自律増殖できる公知のクローニングベクターの適当な部位に該 DNA を挿入することによって調製することができる。用いられるクローニングベクターとしては、宿主が細菌の場合、

大腸菌由来の p B R 系ベクター、p U C 系ベクター等、あるいは枯草菌由来の p U B 1 1 0、p T P 5、p C 1 9 4 等、あるいは放線菌由来の p I J 7 0 2、p S K 1、p S K 2、S C P 2、S C P 1 . 2、p G A 4 8 2、p M C X p r e s s 等が例示される。

- 5 本発明の形質転換体は、本発明の環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子を含む組換えベクターで宿主細胞を形質転換することにより調製することができる。宿主細胞は使用する組換えベクターに適合し、形質転換され得るものであれば特に限定されず、当分野で通常使用される天然に存在する細胞あるいは人工的に作製された変異体細胞もしくは組換え体細胞など種々の細胞が利用できる。
- 10 好ましくは細菌、特に大腸菌、枯草菌、および放線菌等であり、より好ましくは放線菌の一種であるストレプトマイセス属細菌である。

組換えベクターの宿主細胞への導入は従来公知の方法を用いて行なうことができる。例えば、宿主が大腸菌や枯草菌等の細菌の場合には、Cohen らの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 2110 (1972)]、プロトプラスト法 [Mol. Gen. Genet., 168: 111 (1979)] およびコンピテント法 [J. Mol. Biol., 56: 209 (1971)] 等が挙げられる。

15

宿主が放線菌、特にストレプトマイセス属細菌の場合は、transformation Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual. The John Innes Foudation, Norwich, UK, 1985. に記載されている方法 (PEG-assisted protoplast transformation) 等が挙げられる。

20

本発明はまた環状リボペプチドアシラーゼを提供する。

本発明の環状リボペプチドアシラーゼは、上記の環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子を機能的に含む発現ベクターを含むいずれかの形質転換体を適当な培地中で培養し、得られる培養物から当該酵素を採取することにより製造することができる。単離精製については環状リボペプチドアシラーゼ活性の存在する画分に応じて、上述の如く、通常使用される種々の分離技術を適宜組み合わせることにより行なうことができる。各サブユニット単位で製造する場合は、

25

各サブユニットをコードする遺伝子を機能的に含む発現ベクターを用いることで、同様にして製造し得る。

用いられる栄養培地としては、炭素源としてグルコース、キシロース、ガラクトース、グリセリン、スターチ、デキストリン等のような炭水化物が挙げられ、

- 5 他の炭素源としてはマルトース、ラムノース、ラフィノース、アラビノース、マンノース、サリシン、コハク酸ナトリウム、フルクトース、マンニトール、グルシトール、ラクトース、ソルボース、シュクロース等が挙げられる。

- 好ましい窒素源としては、無機もしくは有機窒素源（例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、カゼインの加水分解物、酵母抽出物、ポリペプトン、バクト
10 トリプトン、ビーフ抽出物、大豆粉、小麦胚芽、ポテトプロテイン、米ぬか、ビーナッツパウダー、グルテン、コーン抽出物等）を含んでいてもよい。さらに所望により、他の栄養源〔例えば、無機塩（例えば、二リン酸ナトリウムまたは二リン酸カリウム、リン酸水素二カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム）、ビタミン類（例えば、ビタミンB1）、抗生物質（例えば、
15 アンピシリン、カナマイシン、チオストレプトン）等〕を培地中に添加してもよい。

特に培養培地が著しく発泡する場合には、必要に応じて液状パラフィン、脂肪油、植物油、シリコーン等の消泡剤を添加してもよい。

- 形質転換体の培養は、通常pH 4～9、好適には6～7、15～35℃、好適
20 には25～35℃で10～144時間で行われる。

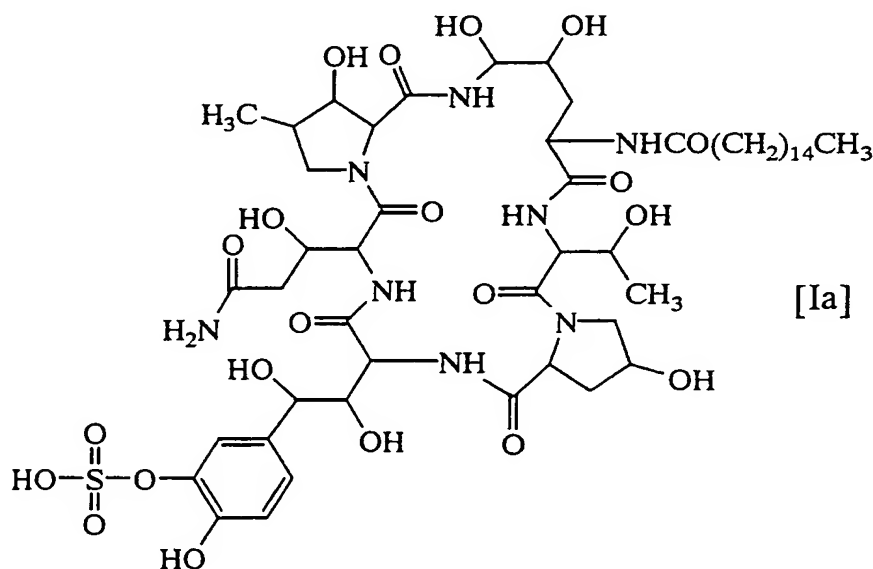
- 本発明の環状リボペプチド物質の側鎖のアシル基を脱アシル化する方法は、上記の環状リボペプチドアシラーゼをコードするDNAを機能的に含む発現ベクターを含有するいずれかの形質転換体を適当な培地中で培養し、得られる培養物をそのまま用いて環状リボペプチド物質を接触させることにより、該物質の側鎖の
25 アシル基をアミノ基へと脱アシル化させる。あるいは当該酵素活性が該形質転換体の菌体内画分に存在する場合にはその菌体抽出液に環状リボペプチド物質を接触させることにより、該物質の側鎖のアシル基をアミノ基へと脱アシル化させる。

菌体抽出液に環状リボペプチド物質を接触させる場合には、培養終了後の培養物を遠心分離または濾過して菌体を回収し、これを適当な緩衝液、例えば酢酸緩衝液中に懸濁して、超音波処理等により菌体を破碎した後遠心処理して得られる上清を菌体抽出液として使用すればよい。

5 また、環状リボペプチドアシラーゼを生産する宿主細胞を当該環状リボペプチド物質存在下で培養することによっても、脱アシル化した環状リボペプチド物質を得ることができる。

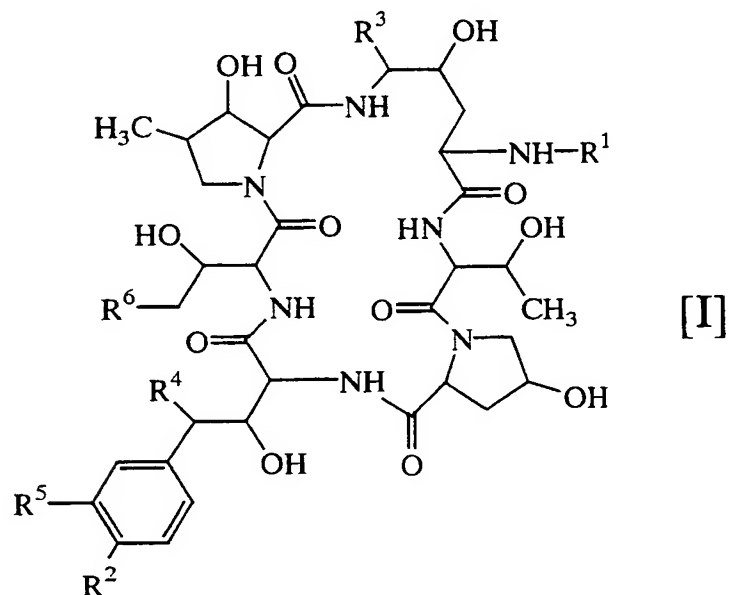
10 本発明の環状リボペプチドアシラーゼの基質となる環状リボペプチド物質とは、ポリペプチド環を有し、該環上に側鎖として「アシルアミノ基」を有する物質をいい、この物質はさらに他の側鎖を有していてもよい。例えばWO 97/32975号公報に記載されたものが挙げられる。

15 該「環状リボペプチド物質」の一例であるFR 901379物質は微生物 *Coleophoma* sp. F-11899 株(FERM BP-2635; 当該株は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に寄託されている、原寄託日平成元年10月26日)によって生産される抗真菌活性を持った既知物質(特開平3-184921号公報)であり、下記構造式[Ia]で示される化合物である。



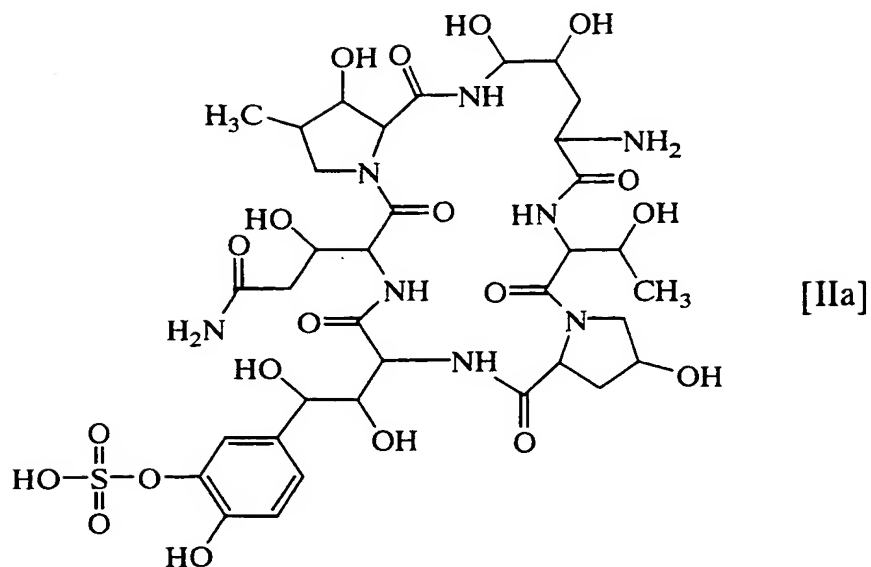
また、FR 901379物質類似体とは、下記一般式[I]で示される化合物

またはその塩をいう。

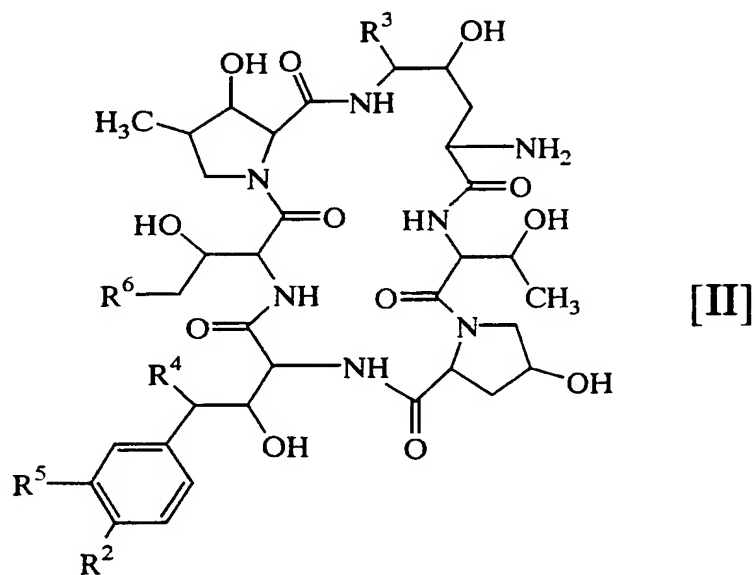


- [式中R¹はアシル基、R²はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、R³は水素またはヒドロキシ基、R⁴は水素またはヒドロキシ基、R⁵は水素またはヒドロキ
5 シスルホニルオキシ基、およびR⁶は水素またはカルバモイル基を意味する]

- 本発明の環状リボペプチドアシラーゼは、環状リボペプチド物質の側鎖の「ア
シルアミノ基」を脱アシル化して、「アミノ基」へと導くものであり、具体的
にはFR 9 0 1 3 7 9 物質またはその塩のパルミトイル側鎖あるいはFR 9 0 1 3
7 9 物質を含む前記一般式 [I] で示されるアシラーゼFR 9 0 1 3 7 9 物質類
10 似体またはその塩のアシル側鎖を脱アシル化して環状リボペプチド物質、具体的
には、下記構造式 [IIa] で示される化合物 (FR 1 7 9 6 4 2 物質) またはそ
の塩



あるいはFR 1 7 9 6 4 2 物質を含む下記一般式 [II] で示されるFR 1 7 9 6 4 2 類似体またはその塩



[式中、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 および R^6 は前記と同じ基を意味する]を生産させるアシラーゼである。

化合物 [I] および [II] の好適な塩は慣用の無毒性のモノまたはジ塩であって、金属塩、例えばアルカリ金属塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（例えばカルシウム塩、マグネシウム塩等）、アンモニウム塩、

有機塩基との塩（例えば、トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N，N'－ジベンジルエチレンジアミン塩等）等、有機酸付加塩（例えばギ酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等）、無機酸付加塩（例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、リン酸塩等）、アミノ酸（例えばアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等）との塩等が挙げられる。

脱アシル化反応終了後、脱アシル化された環状リボペプチド物質、具体的には一般式 [II] で示される F R 1 7 9 6 4 2 類似体（F R 1 7 9 6 4 2 物質を含む）の反応液からの分離・精製は、従来公知の分離・精製法、例えば減圧濃縮、凍結乾燥、抽出、p H 調整、吸着樹脂、イオン交換樹脂、晶析、再結晶等の方法を適宜組み合わせて行なうことができる。

実施例

以下に本発明を具体的に説明するため実施例を示すが、本発明はこれら実施例によって何ら制限されるものではない。

なお、本発明において使用する多くの技法、反応及び分析方法は当業者らに自体周知のものである。又、酵素、プラスミド、宿主等は特に記載のない場合は商業的に入手可能なものである。

実施例 1 Streptomyces sp. No.6907 株が生産する環状リボペプチドアシラーゼ（F R 9 0 1 3 7 9 アシラーゼ）のクローニング

（1）Streptomyces sp. No.6907 株の染色体 D N A の調製

Streptomyces sp. No.6907 株（FERM BP-5809；W O 9 7 / 3 2 9 7 5 号公報；当該株は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号）に寄託されている、原寄託日平成 8 年 3 月 8 日、国際寄託日（移管）平成 9 年 2 月 3 日）の凍結保存液の 1 白金耳を 0.3% 酵母エキス、0.5% ペプトン、0.3% 麦芽エキス、1% グルコース、5% シュクロース、5 mM MgCl₂、0.5% グリシンからなる培地（p H 6.5）で 30℃、48

時間培養した。培養液 10 ml を遠心 (5,000 rpm、10 分間) により集菌した後、QIAGEN Genomic tip 20/G (キアゲン社) を用い、プロトコールに従って処理することで、染色体 DNA を調製した。

(2) 小サブユニットの解析

- 5 ①小サブユニットの既知アミノ末端アミノ酸配列からの PCR 用プライマーの設計

FR 901379 アシラーゼの小サブユニットのアミノ末端アミノ酸配列
Gly Ser Gly Leu Ser Ala Val Ile Arg Tyr Thr Glu Tyr Gly Ile Pro His His
Val Ala (配列表配列番号 5) (WO 97/32975 号公報)

- 10 [尚、当該小サブユニットのアミノ末端アミノ酸配列は、後日詳細な分析により正確な配列が Gly Ser Gly Leu Ser Ala Val Ile Arg Tyr Thr Glu Tyr Gly Ile Pro His Ile Val Ala (配列表配列番号 4) であることがわかった。]

から以下のフォワードプライマー (SF3) とリバースプライマー (SR2) を設計した。

- 15 SF3 -CTS TCS GCS GTS ATC (配列表配列番号 6)

SR2 -GTG GTG SGG GAT SCC (配列表配列番号 7)

S:C または G を表す。

②小サブユニットの既知アミノ末端アミノ酸配列から設計したプライマーを用いての PCR

- 20 上記 (1) で調製した *Streptomyces* sp. No.6907 株の染色体 DNA 100 ng および上記①で設計した各プライマー 1 nmol を用いて、GeneAmp PCR System Model 2400 (パーキンエルマー社) を使用して PCR を行なった。反応混液 50 μ l [PCR 緩衝液中、0.2 mM 各 dNTPs および KOD Dash (東洋紡社) 1.5 ユニット] を、98°C での変性 20 秒間、60°C でのアニーリング 2 秒間、および 74°C でのポリメリゼーション 10 秒間からなる PCR に 30
- 25 回供した。増幅後、小サブユニットの既知アミノ末端の一部をコードする断片 (45 bp) を 5% アガロースゲル電気泳動によって単離した。

③PCR断片のクローニング

上記②で単離したPCR増幅断片(45bp)をpCR-Script Amp Cloning Kit(ストラタジーン社)を用い、プロトコールに従って処理することで、pCR-Script Amp SK(+)に該断片を挿入したプラスミドp3S4を得た。

5 ④塩基配列分析

上記③で得られたプラスミドp3S4の塩基配列分析を310 DNAシーケンサー(パーキンエルマー社)にて、M13シーケンシングプライマーであるリバープライマー(New England Biolabs社)を用いて、ダイデオキシターミネーション法により、添付のプロトコールに従ってシーケンシングを行った。結果を図1に示す。

(3) 大サブユニットの解析

①大サブユニットの既知アミノ末端アミノ酸配列からのPCR用プライマーの設計

FR901379アシラーゼの大サブユニットのアミノ末端アミノ酸配列

15 Ser Asn Ala Val Ala Phe Asp Gly Ser Thr Thr Val Asn Gly Arg Gly Leu Leu
Leu Gly (配列表配列番号3) (WO97/32975号公報)

から以下のフォワードプライマー(LF2)とリバープライマー(LR)を設計した。

LF2 - CS GTS GCS TTC GAC GG (配列表配列番号8)

20 LR - SCC SAG SAG SAG SCC (配列表配列番号9)

S:CまたはGを表す。

②大サブユニットの既知アミノ末端アミノ酸配列から設計したプライマーを用いてのPCR

上記(1)で調製したStreptomyces sp. No.6907株の染色体DNA 100ngおよび上記(3)の①で設計した各プライマー1nmolを用いて、GeneAmp PCR System Model 2400(パーキンエルマー社)を使用してPCRを行なった。
25 反応混液50μL〔PCR緩衝液中、0.2mM各dNTPsおよびKOD Dash

(東洋紡社) 1.5 ユニット] を、98℃での変性20秒間、65℃でのアニーリング2秒間、および74℃でのポリメリゼーション10秒間からなるPCRに30回供した。増幅後、大サブユニットの既知アミノ末端の一部をコードする断片(53bp)を5%アガロースゲル電気泳動によって単離した。

5 ③PCR断片のクローニング

上記(3)の②で単離したPCR増幅断片(53bp)をpCR-Script Amp Cloning Kit(ストラタジーン社)を用い、プロトコールに従って処理することで、pCR-Script Amp SK(+)に該断片を挿入したプラスミドp3L1を得た。

④塩基配列分析

- 10 プラスミドp3L1の塩基配列分析を310 DNAシーケンサー(パーキンエルマー社)にて、M13シーケンシングプライマーであるリバースプライマー(New England Biolabs社)を用いて、ダイデオキシターミネーション法により、添付のプロトコールに従ってシーケンシングを行った。結果を図2に示す。

(4) FR901379アシラーゼの解析

15 ①小、大サブユニット間でのPCRのためのプライマーの設計

今まで知られているアシラーゼでは、そのほとんどが小サブユニット、大サブユニットの順に並んでコードされている。そこで小サブユニットの既知アミノ酸配列内でのPCRから決定した塩基配列をもとに、フォワードプライマー20Sを設計した。同様に、大サブユニットの既知アミノ酸配列内でのPCRから決定した塩基配列をもとに、リバースプライマー19Lを設計した。

20S -ATC CGG TAC ACG GAG TAC GG (配列表配列番号10)

19L -C GTT CAC CGT CGT GGA GCC (配列表配列番号11)

②小、大サブユニット間でのPCR

- 25 上記(1)で調製したStreptomyces sp. No.6907株の染色体DNA100ngおよび上記(4)の①で設計した各プライマー20pmolを用いて、GeneAmp PCR System Model 2400(パーキンエルマー社)を使用してPCRを行った。反応混液50μl〔PCR緩衝液中、0.2mM各dNTPsおよび

KOD Dash (東洋紡社) 2.5 ユニット] を、98℃での変性20秒間、70℃でのアニーリング2秒間、および74℃でのポリメリゼーション20秒間からなるPCRに30回供した。増幅後、該アシラーゼの一部をコードする断片(約600bp)を2%アガロースゲル電気泳動によって単離した。

5 ③PCR断片のクローニング

上記(4)の②で単離したPCR増幅断片(約600bp)をpCR-Script Amp Cloning Kit (ストラタジーン社)を用い、プロトコールに従って処理することで、pCR-Script Amp SK(+)に該断片を挿入したプラスミドpSL1を得た。

④塩基配列分析

- 10 上記(4)の③で得られたプラスミドpSL1の塩基配列分析を310 DNA シークエンサー (パーキンエルマー社) にて、M13 シークエンシングプライマーであるフォワードプライマーおよびリバースプライマー (New England Biolabs 社) を用いて、ダイデオキシターミネーション法により、添付のプロトコールに従ってシークエンシングを行った。その結果、該アシラーゼと思われる遺伝子の一部を
- 15 取得できた。

(5) 染色体DNAライブラリーの調製

- 上記(1)で調製した *Streptomyces* sp. No.6907 株の染色体DNA 1 μ g を Sau3A I(100 mU)で37℃、10分間処理することで、部分消化した。また、コスミド pcos6EMBL (Gene, 57, 229-237 (1987)参照) 1 μ g を BamH I 5Uで3
- 20 7℃、1時間処理した。両処理液をエタノール沈殿後、2倍希釈 TE (5 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.5 mM) 5 μ l で溶解後、10x T4 DNA ligase bufer (660 mM Tris-HCl (pH7.6), 66 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 1 mM ATP) 0.7 μ l と T4 DNA ligase 0.7 μ l を加え、22℃、3時間保温した。このライゲーション液3 μ l を GIGAPACK III XL Packaging Extract (ストラタジーン社)を用い、
- 25 プロトコールに従いインビトロ・パッケージングした。このパッケージング液を指示菌 *E. coli* XL-1 Blue MRA に接触させることで、コスミドライブラリーを構築した。

(6) コロニー直接PCRによるスクリーニング

上で得られた 480 個のコスミドクローンを、プライマー20S および 19L 各 20 pmol を用いて、GeneAmp PCR System Model 2400 (パーキンエルマー社) を使用してコロニー直接PCRを行なった。反応混液 20 μ l [PCR緩衝液中、0.2 mM各dNTPs および KOD Dash (東洋紡社) 2.5 ユニット] を、98℃での変性20秒間、68℃でのアニーリング2秒間、および74℃でのポリメリゼーション20秒間からなるPCRに30回供したところ、約600bpの断片が特異的に増幅したコスミドクローンNo. 133を得た。

(7) コスミドクローンNo. 133のサブクローニング

10 コスミドクローンNo. 133を EcoR I と Pst I で消化し、得られた約8kbの断片を pUC18 の EcoR I/Pst I サイトに挿入することで、プラスミド pEP1を得た。さらに、プラスミド pEP1 を EcoR I と BamH I で消化し、得られた約5.5kbの断片を pUC18 の EcoR I/BamH I サイトに挿入することで、プラスミド pEB を得た。

15 (8) 塩基配列分析

プラスミド pEB の塩基配列分析を 310 DNA シークエンサー (パーキンエルマー社) にて、M13 シークエンシングプライマーであるフォワードプライマー、リバースプライマー (New England Biolabs 社) および表1に記載する合成オリゴヌクレオチドを用いて、ダイデオキシターミネーション法により、添付のプロト
20 コールに従ってシークエンシングを行った。

表 1

AC1	CAA	CTG	CGC	GTA	GTC	C	(配列表配列番号13)
AC2	CAT	GGG	TTC	CAA	CGC	G	(配列表配列番号14)
AC3	GCT	GTC	AAC	CGT	CTG	G	(配列表配列番号15)
AC4	ACG	CGC	TGA	ACG	ATC	C	(配列表配列番号16)
AC5	CGG	ACC	TGG	ACC	TAC	C	(配列表配列番号17)
AC6	GTG	GGT	GAA	CAC	GAT	CG	(配列表配列番号18)
AC7	GAC	CTT	CAG	CGG	CAG	C	(配列表配列番号19)
AC8	CAA	GTG	GTG	TGC	GGC	G	(配列表配列番号20)
AC9	GTC	GCT	GGG	CAT	CTG	G	(配列表配列番号21)
AC10	GCT	GCT	GAC	GTA	CTC	C	(配列表配列番号22)
AC11	GTC	AAC	CGC	ATG	GTC	C	(配列表配列番号23)
AC12	ATC	GCC	TGG	ATC	GTC	G	(配列表配列番号24)
AC13	CGT	CAG	CGC	GAT	CAC	C	(配列表配列番号25)
AC14	GGT	GTA	CAG	CAG	CTG	C	(配列表配列番号26)
AC15	CTC	CCT	CGT	CCT	GAC	C	(配列表配列番号27)
AC16	GAG	TTG	TGC	GCG	TAG	G	(配列表配列番号28)
AC17	TGA	CGC	TTG	GCC	GTC	C	(配列表配列番号29)
AC18	GAC	TAC	GCG	CAG	TTG	G	(配列表配列番号30)
AC19	TAC	AAC	GCG	TGG	ATC	G	(配列表配列番号31)
AC20	GGT	GAT	CCG	GTT	CTG	C	(配列表配列番号32)
AC21	GGG	TAG	TGC	GGG	TTG	C	(配列表配列番号33)
AC22	CTG	CAT	CAG	CTC	AGC	C	(配列表配列番号34)
AC23	GTC	CAC	CAC	TGG	GTG	C	(配列表配列番号35)
AC24	GAA	GCG	GGG	TAG	GTG	G	(配列表配列番号36)
AC25	CCG	GTG	CTG	AAG	AAC	C	(配列表配列番号37)
AC26	CTG	CCG	CTG	AAG	GTC	C	(配列表配列番号38)
AC27	TCG	AAC	GGC	GTC	CTC	C	(配列表配列番号39)
AC28	TGG	AGG	ACG	CCG	TTC	G	(配列表配列番号40)
AC29	GCC	TGG	ATG	TAG	CTG	G	(配列表配列番号41)
AC30	GGA	CAT	CGC	GCG	TTC	G	(配列表配列番号42)
AC31	CGA	ACG	CGC	GAT	GTC	C	(配列表配列番号43)
AC32	CCG	TGA	CCA	TGC	GTG	C	(配列表配列番号44)
AC33	GCA	CGC	ATG	GTC	ACG	G	(配列表配列番号45)
AC34	GAG	GAG	ACC	TAC	CTC	G	(配列表配列番号46)
AC35	AGG	TCC	CGC	TAC	GAC	G	(配列表配列番号47)
AC36	GAC	CAT	GCG	GTT	GAC	G	(配列表配列番号48)
AC37	CAG	TTC	CGC	CTC	GTC	G	(配列表配列番号49)
AC38	CAG	GTG	GAC	GTT	GTC	G	(配列表配列番号50)
AC39	GTC	GCT	GAC	GAT	CAC	G	(配列表配列番号51)
AC40	GTG	ATC	GTC	AGC	GAC	C	(配列表配列番号52)
AC41	GGC	GGT	GAT	GAA	GTC	G	(配列表配列番号53)
AC42	CGA	CTT	CAT	CAC	CGC	C	(配列表配列番号54)
AC43	GGC	GAC	TTC	TTC	ACC	G	(配列表配列番号55)
AC44	CGG	TGA	AGA	AGT	CGC	C	(配列表配列番号56)
AC45	CCA	GAC	GGT	TGA	CAG	C	(配列表配列番号57)

塩基配列の解析により、ORFが見いだされ、その中に小サブユニットおよび大サブユニットのアミノ末端アミノ酸配列に対応するDNA配列がすべて含まれていた。このアシラーゼ遺伝子を含むプラスミド pEB の塩基配列を配列表配列番号 1 に示す。

5 実施例 2 環状リボペプチドアシラーゼの宿主細胞での発現

(1) ストレプトマイセス・リビダンス 1326/pIJ702-SB の構築

プラスミド pEB の EcoR I サイトを Sac I サイトに変換したプラスミド pSB を構築することにした。まず、合成オリゴマー (AAT TGA GCT C ; 配列表配列番号 12) 100 pmol を 30 U の T4 polynucleotide kinase で 37 °C、1 時間
10 処理することで、5'-OH 末端をリン酸化した。そして、その反応液を 70 °C、10 分間加熱し、T4 polynucleotide kinase を失活させた。一方、1 µg のプラスミド pEB を 5 U の EcoR I で処理した後、1 U の Bacterial Alkaline Phosphatase (BAP) で 37 °C、1 時間処理することで、5'末端を脱リン酸化した。この 2 つの処理液を Ligation High (東洋紡社) でライゲーションすることで、
15 プラスミド pSB を構築した。

5 µg のプラスミド pSB を 20 U の Sac I と 20 U の BamH I で処理することで、アシラーゼ遺伝子を含む 5.7 kb の Sac I-BamH I 断片を得た。また、放線菌用ベクターである pIJ702 (2 µg) (ATCC 35287) を 10 U の Sac I と 10 U の Bgl II で処理し、先に調製したアシラーゼ遺伝子を含む 5.7 kb の Sac I-BamH I 断片と Ligation High (東洋紡社) 存在下ライゲーションした。そのライゲーション液を Genetic Manipulation of Streptomyces. A Laboratory Manual. The John Innes Foudation, Norwich, UK, 1985. に記載されている方法に従って、
20 ストレプトマイセス・リビダンス 1326 株 (J. General Microbiology 1983, 129, 2703-2713) を形質転換した。得られた形質転換株のうち 1 株をストレプトマイセス・リビダンス 1326/pIJ702-SB とした (図 3)。
25

(2) 形質転換株の培養および FR 901379 アシラーゼの発現

5 % シュクロース、1 % グルコース、0.3 % 酵母エキス (Difco 社)、0.

5 %バクトペプトン (Difco 社)、0.3 %肉エキス (Difco 社)、5 mM MgCl_2 、0.5 %グリシン、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のチオストレプトン (pH 6.5) からなる培地10 mlを100 ml容三角フラスコに入れ、形質転換株ストレプトマイセス・リビダンス 1326/pIJ702-SB の5 mm角の菌体を植菌した。30℃、3日間 (260 rpm) 培養し、その培養液のFR 901379アシラーゼ活性を測定したところ、培養液1 ml当たり1時間に30 mgのFR 179642 (脱アシル化したFR 901379物質) を生成する活性が得られた。

また、アシラーゼ活性が最高に達するまでの培養期間は、形質転換株ストレプトマイセス・リビダンス 1326/pIJ702-SB については2～3日、*Streptomyces* sp. No.6907については7日と半分以下に短縮された。

当該アシラーゼ活性は以下のようにして測定した。

<アシラーゼ活性の測定>

100 mg/ml FR 901379 (WO 97/32975号公報参照) 水溶液0.1 ml、リン酸緩衝液 (pH 6.0) 0.1 ml、メタノール0.1 ml、蒸留水0.6 mlからなる溶液に、培養液0.1 mlを加え、37℃ (125 rpm) で反応させる。15分後、4 %酢酸1 mlと蒸留水2 mlを添加することで、反応を終了させる。そして、生成したFR 179642 (脱アシル化したFR 901379物質) を高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて、以下の条件で定量する。

20 カラム ; Kaseisorb LC P0 Super (4.6 mm I.D. x 250 mm) (東京化成社)
カラム温度 ; 50℃
溶離液 ; 蒸留水 : メタノール : リン酸 = 960 : 40 : 1
流速 ; 1 ml/min
検出 ; UV-215 nm

25 実施例 3

(1) 発酵液の調製

500 mL容フラスコに50 mLのチオストレプトン ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) を含

むPM-1培地(6%日食#3600、3%脱脂大豆粉、0.5%CaCO₃、0.005%チオストレプトン、pH無修正)を入れ、形質転換株ストレプトマイセス・リビダンス 1326/pIJ702-SB の5mm角の菌体を植菌した後、30℃で3日間培養した。その2.5mLを50mLのSG培地(8%マルトース、3%
5 脱脂大豆粉、3%脱脂小麦胚芽、0.5%CaCO₃、0.005%チオストレプトン、pH無修正)を入れた500mL容フラスコに植菌し、30℃で3日間培養した。

(2) FR901379アシラーゼの精製

発酵液24mLに4M KClを8mL加え、4℃で一晩放置した後、遠心
10 (10,000rpm、10分間)により得られた上清をKCl抽出液とした。このKCl抽出液をMicrocon 50(ミリポア社)で10倍濃縮、0.5Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)で元の液量まで戻すという操作を2回繰り返すことで、低分子のタンパク質を除いた。

(3) SDS-PAGE分析

15 マルチゲル10/20または15/25(第一化学薬品社;アクリルアミド10~20%または15~25%グラジエントゲル)を用いて、SDS-PAGE分析を行なった。

(4) FR901379アシラーゼ活性の測定

実施例2に準じて測定した。

20 (5) タンパク質の定量

DCプロテインアッセイ(Lowry法;バイオラッド社)でアルブミンをスタンダードとして測定した。

(6) アミノ末端アミノ酸配列分析

SDS-PAGE後のゲル中のタンパク質をホライズプロット(アトー社)に
25 より、電気泳動的にPVDF膜に移した後、CBB染色し、目的のバンドをはさみで切断した。そしてアミノ末端アミノ酸配列分析に付した。

分析結果から、配列表配列番号4に記載されるN末端アミノ酸配列を有するも

のが45%、さらにそのN末端にセリン残基が付加されたN末端アミノ酸配列を有するものが55%の割合で環状リボペプチドアシラーゼ小サブユニットが生産されることがわかった。

5

産業上の利用分野

本発明の、環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子を導入して得られた形質転換体から得られる組換え環状リボペプチドアシラーゼは、従来の *Streptomyces* sp.No.6907 株や *Streptomyces anulatus* No.8703 株等の環状リボペプチドアシラーゼを生産する天然分離株を培養して得られるアシラーゼと同等の活性を有し、且つ当該形質転換体を使用することにより、その培養にかかる時間（すなわち環状リボペプチドアシラーゼの生産にかかる時間）を短縮することが可能となった。

15

本出願は、日本で出願された平成11年特許願第189644号を基礎としておりそれらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

配列表フリーテキスト

20

配列番号6：FR901379アシラーゼ小サブユニットのN末端アミノ酸をコードする領域のDNAを増幅するためのフォワードプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号7：FR901379アシラーゼ小サブユニットのN末端アミノ酸をコードする領域のDNAを増幅するためのリバースプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

25

配列番号8：FR901379アシラーゼ大サブユニットのN末端アミノ酸をコードする領域のDNAを増幅するためのフォワードプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号9：FR901379アシラーゼ大サブユニットのN末端アミノ酸をコ

ードする領域のDNAを増幅するためのリバースプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号10：FR901379アシラーゼの小サブユニットおよび大サブユニットの間のアミノ酸をコードする領域のDNAを増幅するためのフォワードプライ

5 イマー

配列番号11：FR901379アシラーゼの小サブユニットおよび大サブユニットの間のアミノ酸をコードする領域のDNAを増幅するためのリバースプライマー

配列番号12：制限部位をEcoRIサイトからSacIサイトに変換する為に使用

10 すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号13：シーケンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号14：シーケンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

15 配列番号15：シーケンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号16：シーケンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号17：シーケンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

20 ヌクレオチド

配列番号18：シーケンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号19：シーケンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

25 配列番号20：シーケンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号21：シーケンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 22 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 23 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

5 ヌクレオチド

配列番号 24 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 25 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

10 配列番号 26 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 27 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 28 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

15 ヌクレオチド

配列番号 29 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 30 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

20 配列番号 31 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 32 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 33 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

25 ヌクレオチド

配列番号 34 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 35 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 36 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

5 配列番号 37 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 38 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

10 配列番号 39 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 40 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 41 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

15 配列番号 42 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 43 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

20 配列番号 44 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 45 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 46 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

25 配列番号 47 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴヌクレオチド

配列番号 48 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ

ヌクレオチド

配列番号 4 9 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 5 0 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 5 1 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 5 2 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

10 配列番号 5 3 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 5 4 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 5 5 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 5 6 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

配列番号 5 7 : シークエンシングプライマーとして作用すべく設計されたオリゴ
ヌクレオチド

20

請求の範囲

1. 以下の(a)、(b)または(c)の全部または一部を含む、環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子。

(a)配列表配列番号 1 で示される塩基配列からなる DNA

5 (b)上記(a)の DNA とストリンジェントな条件でハイブリダイズし得る DNA

(c)配列表配列番号 1 で示される塩基配列において少なくとも(1)60%の同一性、(2)70%の同一性、(3)80%の同一性、(4)90%の同一性、または(5)95%の同一性を有する DNA

2. 以下の(a)または(b)のタンパク質またはその一部をコードする遺伝子。

10 (a)配列表配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ環状リボペプチドアシラーゼ活性を有するタンパク質

3. 請求の範囲 1 または 2 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

15 4. 請求の範囲 1 または 2 記載の遺伝子を機能的に含む発現ベクター。

5. 請求の範囲 3 または 4 記載のベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

6. 請求の範囲 4 記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から、環状リボペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基をアミノ基へと脱アシル化する反応を触媒し得る環状リボペプチドアシラーゼを採取することを含む該環状リボペプチドアシラーゼの製造方法。

20 7. 請求の範囲 6 記載の製造方法によって製造される環状リボペプチドアシラーゼ。

8. 以下の(a)、(b)または(c)の全部または一部を含む、環状リボペプチドアシラーゼをコードする遺伝子。

25 (a)配列表配列番号 1 に示される塩基配列中塩基番号 1065～3359 で示される塩基配列からなる DNA

(b)上記(a)のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし得るDNA

(c)配列表配列番号1に示される塩基配列中塩基番号1065～3359で示される塩基配列において少なくとも(1)60%の同一性、(2)70%の同一性、(3)80%の同一性、(4)90%の同一性、または(5)95%の同一性を有するDNA

5 9. 以下の(a)または(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a)配列表配列番号2で示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号1または1～765からなるタンパク質

(b)アミノ酸配列(a)において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ環状リボペプチドアシラーゼ活性を有する

10 タンパク質

10. 請求の範囲8または9記載の遺伝子を含む組換えベクター。

11. 請求の範囲8または9記載の遺伝子を機能的に含む発現ベクター。

12. 請求の範囲10または11記載のベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

15 13. 請求の範囲11記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から、環状リボペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基をアミノ基へと脱アシル化する反応を触媒し得る環状リボペプチドアシラーゼを採取することを含む該環状リボペプチドアシラーゼの製造方法。

20 14. 請求の範囲13記載の製造方法によって製造される環状リボペプチドアシラーゼ。

15. 配列表配列番号1に示される塩基配列中塩基番号1065～3359で示される塩基配列からなるDNAがコードする環状リボペプチドアシラーゼ。

25 (3)80%の同一性、(4)90%の同一性、または(5)95%の同一性を有するDNAがコードする環状リボペプチドアシラーゼ。

17. 以下の(a)または(b)のタンパク質。

(a)配列表配列番号 2 に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 ~ 200 のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)上記(a)のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ下記(c)または(d)のタンパク質と複

5 合体を形成して環状リボペプチドアシラーゼ活性を示すタンパク質

(c)配列表配列番号 2 に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 201 ~ 765 のアミノ酸配列からなるタンパク質

(d)上記(c)のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ上記(a)または(b)のボ

10 リペプチドと複合体を形成して環状リボペプチドアシラーゼ活性を示すタンパク質

18. 以下の(c)または(d)のタンパク質

(c)配列表配列番号 2 に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 201 ~ 765 のアミノ酸配列からなるタンパク質

15 (d)上記(c)のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ下記(a)または(b)のタンパク質と複合体を形成して環状リボペプチドアシラーゼ活性を示すタンパク質

(a)配列表配列番号 2 に示されるアミノ酸配列中アミノ酸番号 1 または 1 ~ 200 のアミノ酸配列からなるタンパク質

20 (b)上記(a)のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、且つ上記(c)または(d)のタンパク質と複合体を形成して環状リボペプチドアシラーゼ活性を示すタンパク質

19. 請求の範囲 17 記載のタンパク質をコードする DNA

25 20. 請求の範囲 18 記載のタンパク質をコードする DNA

21. 請求の範囲 19 および 20 の少なくとも一方を含む組換えベクター。

22. 請求の範囲 19 および 20 の少なくとも一方を含む発現ベクター。

23. 請求の範囲 2 1 または 2 2 記載のベクターで宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

24. 請求の範囲 2 2 記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞を培地中で培養し、得られる培養物から、環状リボペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基を
5 アミノ基へと脱アシル化する反応を触媒し得る環状リボペプチドアシラーゼを採取することを含む該環状リボペプチドアシラーゼの製造方法。

25. 請求の範囲 2 4 記載の製造方法によって製造される環状リボペプチドアシラーゼ。

26. 請求の範囲 4、1 1、2 2 記載の発現ベクターで形質転換された宿主細胞
10 を培地中で培養し、得られる培養物またはその処理物に環状リボペプチド物質を接触させる工程を含む、環状リボペプチド物質の側鎖のアシルアミノ基をアミノ基へと脱アシル化する方法。

図 1

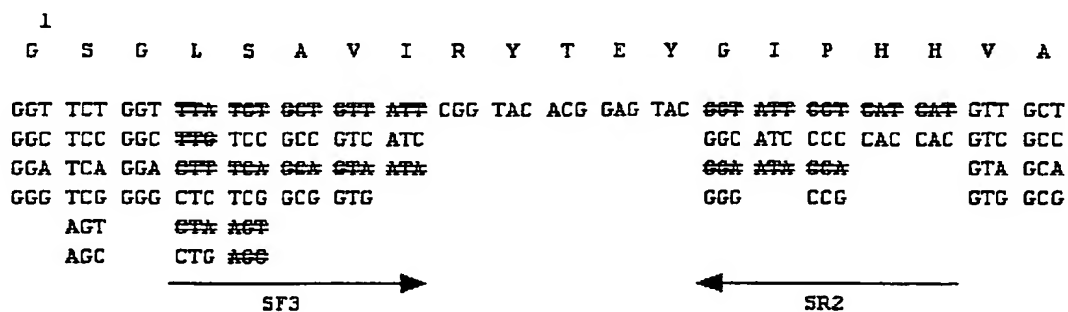
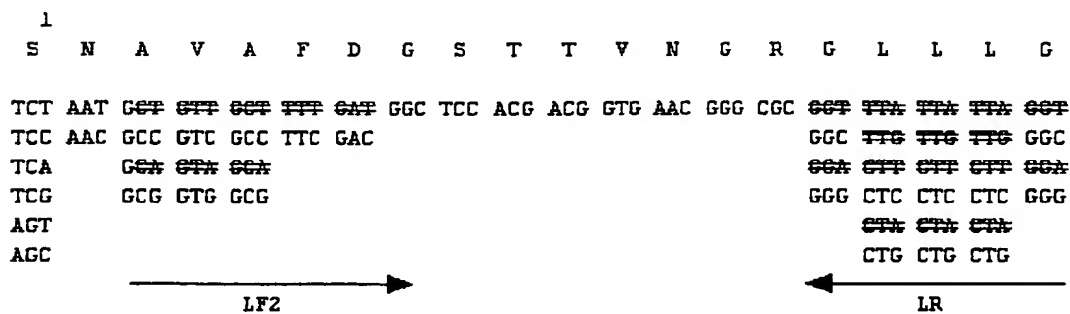
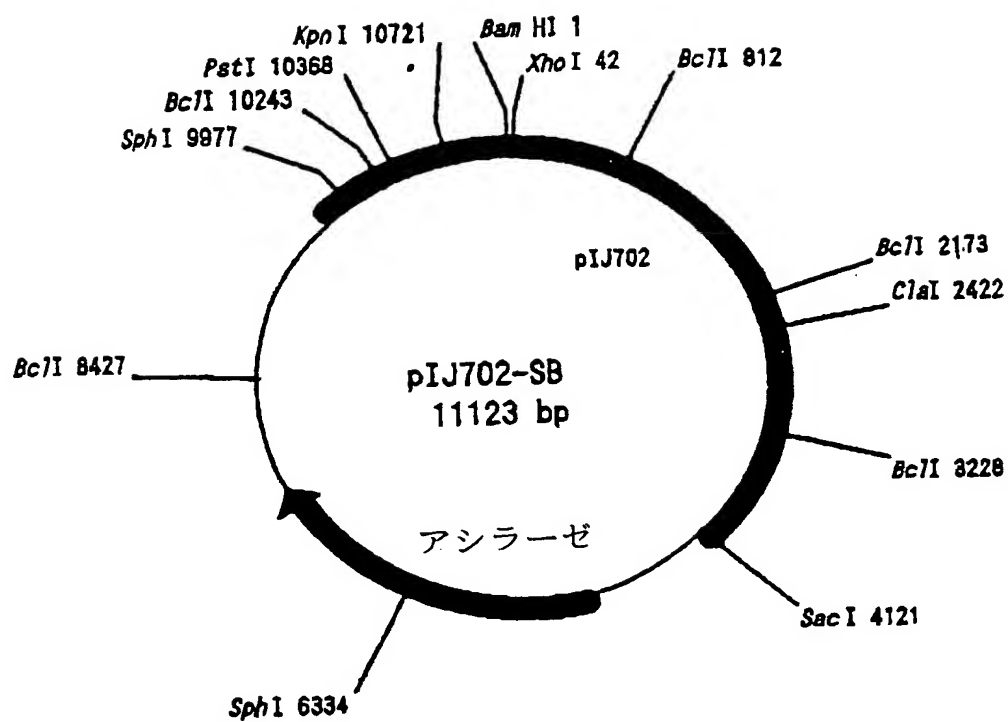


図 2



THIS PAGE BLANK (11SP70)

図3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

配列表

<110> Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> A GENE CODING A CYCLIC LOPOPEPTIDE ACYLASE AND AN EXPRESSION THEREOF

<130> 09368

<150> JP 11-189644

<151> 1999-7-2

<160> 57

<210> 1

<211> 5692

<212> DNA

<213> Streptomyces Sp.

<220>

<221> CDS

<222> (948)..(3362)

<400> 1

gaattccgga tggttggaga ggccgatcca gacggtgggc ggggcgaaga ggctgtcggc 60

caggcccgtc tcgacgaggt cgaagatcga ggcggcgtcc ggaccgtcca ggatgggtgtt 120

ctccgcgccg accgccagat agggcagcag gaacacgtgc atctgggccg agtggttagag 180

cggcagggag tgcacgggcc ggtcggtcgc ggcgaggccg agcgcggtga tcgcgctgac 240

gtactcgtgg accagggcc cgtgcgtcat catcgcgcc ttgggcaggc cggtgggtccc 300

THIS PAGE BLANK (11/15/70)

ggaggtgtac agcagctgca ccaggtcgtc ggaggcgggc gggcgccgcg ggggtgaacgc 360
 ccgttccgtc tccagggcgt cgagcagcga gccgggcgcg tcgcggagcg cgcgcaccgg 420
 gagtccggcg gggagccgcc cggcgaggtc cgggtcggtc aggacgaggg aggagccgga 480
 ctggtcgagg aggtaggcca ggtcgtcgcc ggtgaggttc tggttgaccg gtacgtggac 540
 gagaccggcc cgtgcgcagg cgaggaagcc gatcagatag gcgtcggagt tgtgcgcgta 600
 ggcggccacc cggtcgccgg gggcgagagc gtactcctcg gtgaggacgg cggcggccgt 660
 ggagacggcg gcgtccaggg agcggtaggt ccaggtccgg tcggcgtacc gcacggcggg 720
 ccggtcgggg gtgcgccggg cgctgcgggt gaggacgccg tcgactgtgc tgctgcgtac 780
 acctgtcatg gcgtgatact gtgcgtccgg gccctcgggg gtcaagaggc tggataccga 840
 ccagacgggt gacagcttcc cgggctccct ggctgagtga cgcttggccg tccgggcgtt 900
 ccggaccggc cgcgcccggt ccaccggtac cgctgggagg aaacacc ttg acg tta 956

Leu Thr Leu

cgc aac cgt ctg aga ctg ctc ggg gtc gcc ggt ctc gcc ctg ttc acc 1004
 Arg Asn Arg Leu Arg Leu Leu Gly Val Ala Gly Leu Ala Leu Phe Thr
 -35 -30 -25
 gtg tcg gcg tcg ctg ccg cct gcc acc gcg tcc ggg acc cag gag acg 1052
 Val Ser Ala Ser Leu Pro Pro Ala Thr Ala Ser Gly Thr Gln Glu Thr
 -20 -15 -10 -5
 cgg cac ccg tcc ggg agc ggt ctt tcg gcc gtc atc cgg tac acg gag 1100
 Arg His Pro Ser Gly Ser Gly Leu Ser Ala Val Ile Arg Tyr Thr Glu
 1 5 10
 tac ggc att ccg cac atc gtg gcg gag gac tac gcg cag ttg ggc ttc 1148
 Tyr Gly Ile Pro His Ile Val Ala Glu Asp Tyr Ala Gln Leu Gly Phe
 15 20 25
 ggc acc ggc tgg gcg cag gcc gcc gat cag gtg tgc acg ctg gcg gac 1196
 Gly Thr Gly Trp Ala Gln Ala Ala Asp Gln Val Cys Thr Leu Ala Asp

THIS PAGE BLANK (USPTO)

30	35	40	
ggc ttc ctc acg gtg cgc ggg gag cgg tgc agg ttc ttc ggc ccg gac			1244
Gly Phe Leu Thr Val Arg Gly Glu Arg Ser Arg Phe Phe Gly Pro Asp			
45	50	55	60
gcc gcc acg gac tac tcc ctc tcc tgc gcg gcg acg aac ctc tcc agc			1292
Ala Ala Thr Asp Tyr Ser Leu Ser Ser Ala Ala Thr Asn Leu Ser Ser			
	65	70	75
gac ctg tac ttc cgg ggc gtc cgc gac agc ggc acg gtg gag aag ctg			1340
Asp Leu Tyr Phe Arg Gly Val Arg Asp Ser Gly Thr Val Glu Lys Leu			
	80	85	90
ctc aag gag ccc gcg ccc gcc ggt ccg agc agg gac gtc aag gag acg			1388
Leu Lys Glu Pro Ala Pro Ala Gly Pro Ser Arg Asp Val Lys Glu Thr			
	95	100	105
atg cgc ggg ttc gcc gcc ggg tac aac gcg tgg atc gcg cag aac cgg			1436
Met Arg Gly Phe Ala Ala Gly Tyr Asn Ala Trp Ile Ala Gln Asn Arg			
	110	115	120
atc acc gac ccc gcc tgc cgg ggc gcg tcc tgg gtg cgc ccg gtg acg			1484
Ile Thr Asp Pro Ala Cys Arg Gly Ala Ser Trp Val Arg Pro Val Thr			
	125	130	135
gcg ctg gac gtg gcg gcg cgc ggc tac gcg ctg gcg gtg ctc ggc ggc			1532
Ala Leu Asp Val Ala Ala Arg Gly Tyr Ala Leu Ala Val Leu Gly Gly			
	145	150	155
cag ggg cgc ggc atc gac ggc atc acc gcg gca cag ccg ccg acc gcc			1580
Gln Gly Arg Gly Ile Asp Gly Ile Thr Ala Ala Gln Pro Pro Thr Ala			
	160	165	170
gct cct ccg gcg gcc ggg gtc acg ccc gag gag gcg gcg acg gcg gcg			1628
Ala Pro Pro Ala Ala Gly Val Thr Pro Glu Glu Ala Ala Thr Ala Ala			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

175	180	185	
gag cgg ctg ctg tcg acg cag aac gcg gac atg ggt tcc aac gcg gtg			1676
Glu Arg Leu Leu Ser Thr Gln Asn Ala Asp Met Gly Ser Asn Ala Val			
190	195	200	
gcc ttc gac ggc tcc acg acg gtg aac ggg cgc ggg ctg ttg ctc ggc			1724
Ala Phe Asp Gly Ser Thr Thr Val Asn Gly Arg Gly Leu Leu Leu Gly			
205	210	215	220
aac ccg cac tac ccg tgg cag ggc gga cgc cgc ttc tgg cag gcg cag			1772
Asn Pro His Tyr Pro Trp Gln Gly Gly Arg Arg Phe Trp Gln Ala Gln			
	225	230	235
cag acg atc ccc ggc gag ctg aac gtg tcg ggc gcg tcc ctg ctg ggc			1820
Gln Thr Ile Pro Gly Glu Leu Asn Val Ser Gly Ala Ser Leu Leu Gly			
240	245	250	
gcg acg acg atc tcg atc ggg cac aac gcc gat gtg gcg tgg agc cat			1868
Ala Thr Thr Ile Ser Ile Gly His Asn Ala Asp Val Ala Trp Ser His			
255	260	265	
acg gtc gcc acg ggc gtc acg ctg aat ctg cat cag ctc agc ctc gat			1916
Thr Val Ala Thr Gly Val Thr Leu Asn Leu His Gln Leu Ser Leu Asp			
270	275	280	
ccg gcc gac ccg acc gtc tat ctg gtg gac ggg aag cgg gag cgg atg			1964
Pro Ala Asp Pro Thr Val Tyr Leu Val Asp Gly Lys Arg Glu Arg Met			
285	290	295	300
acg cag cgg acg gtg agc gtc ccg gtg aag ggc ggg gcc gac gtg acc			2012
Thr Gln Arg Thr Val Ser Val Pro Val Lys Gly Gly Ala Asp Val Thr			
	305	310	315
cgc acc cag tgg tgg acc cgc tac ggg ccg gtg gcc acc tcg atg ggc			2060
Arg Thr Gln Trp Trp Thr Arg Tyr Gly Pro Val Ala Thr Ser Met Gly			

THIS PAGE BLANK (ISPTO)

320	325	330	
gcg ggg ctg ccg ttg ccg tgg acg gcg agc acg gcg tac gcg ctg aac			2108
Ala Gly Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ala Ser Thr Ala Tyr Ala Leu Asn			
335	340	345	
gat ccg aac gcg acg aat ctg cgg atg gcg gac acc ggt ctg ggc ttc			2156
Asp Pro Asn Ala Thr Asn Leu Arg Met Ala Asp Thr Gly Leu Gly Phe			
350	355	360	
ggc aag gcc cgc tcc acg ggt gac gtc gag cgt gcg ctg cac cgg tcg			2204
Gly Lys Ala Arg Ser Thr Gly Asp Val Glu Arg Ala Leu His Arg Ser			
365	370	375	380
cag ggc atg ccg tgg gtg aac acg atc gcg gcg gac cgg gcg ggt cgc			2252
Gln Gly Met Pro Trp Val Asn Thr Ile Ala Ala Asp Arg Ala Gly Arg			
385	390	395	
tcg ttc ttc gcg cag tcg cag gtg ctg ccg agg atc acc gac gcg ttg			2300
Ser Phe Phe Ala Gln Ser Gln Val Leu Pro Arg Ile Thr Asp Ala Leu			
400	405	410	
gcg gag cgc tgc tcg acc ccg ctg ggc cgg gcc acc tac ccc gct tcc			2348
Ala Glu Arg Cys Ser Thr Pro Leu Gly Arg Ala Thr Tyr Pro Ala Ser			
415	420	425	
ggc ctc gcg gtg ctg gac ggt tcg cgg acg gac tgc gcg ctg ggc agc			2396
Gly Leu Ala Val Leu Asp Gly Ser Arg Thr Asp Cys Ala Leu Gly Ser			
430	435	440	
gac ccg gac gcg gtg cgg ccg ggg atc ttc ggc ccg ggc cgg atg ccg			2444
Asp Pro Asp Ala Val Arg Pro Gly Ile Phe Gly Pro Gly Arg Met Pro			
445	450	455	460
gtg ctg aag aac cag ccg tac gtg gag aac tcc aac gac agc gcg tgg			2492
Val Leu Lys Asn Gln Pro Tyr Val Glu Asn Ser Asn Asp Ser Ala Trp			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

465	470	475	
ctg acc aat gcg gag cgg ccg	ctg acc ggg tac gag cgg gtc ttc ggc		2540
Leu Thr Asn Ala Glu Arg Pro	Leu Thr Gly Tyr Glu Arg Val Phe Gly		
480	485	490	
acg atc gcg acg ccc cgg tcg	atg cgg acg cgc ggc gcg atc gag gac		2588
Thr Ile Ala Thr Pro Arg Ser	Met Arg Thr Arg Gly Ala Ile Glu Asp		
495	500	505	
gtc gcg tcg atg gcg gac cgg	ggc cgc ctc cgg gtc ggg gac ctt cag		2636
Val Ala Ser Met Ala Asp Arg	Gly Arg Leu Arg Val Gly Asp Leu Gln		
510	515	520	
cgg cag cag ttc gcc aac cgt	gcg ccg gcc ggg gat ctg gcc gcc tcc		2684
Arg Gln Gln Phe Ala Asn Arg	Ala Pro Ala Gly Asp Leu Ala Ala Ser		
525	530	535	540
gag gcc gcc aag tgg tgt gcg	gcg ctg ccg ggc ggc acg gcc gtg ggc		2732
Glu Ala Ala Lys Trp Cys Ala	Ala Leu Pro Gly Gly Thr Ala Val Gly		
545	550	555	
tcc gac gga acg ccg gtc gac	gtg tcg gcg gcc tgc cgg gtg ctg cgg		2780
Ser Asp Gly Thr Pro Val Asp	Val Ser Ala Ala Cys Arg Val Leu Arg		
560	565	570	
cgc tgg gac cgg acc gtg gac	agc gac agc cgg ggc gcg ctg ctc ttc		2828
Arg Trp Asp Arg Thr Val Asp	Ser Asp Ser Arg Gly Ala Leu Leu Phe		
575	580	585	
gac cgg ttc tgg cgg aag gcg	tcg tcg gcg ccc gcc gcc gag ctg tgg		2876
Asp Arg Phe Trp Arg Lys Ala	Ser Ser Ala Pro Ala Ala Glu Leu Trp		
590	595	600	
agg acg ccg ttc gat ccg gcc	gac ccg gtg cgc act ccg cgc ggc ctg		2924
Arg Thr Pro Phe Asp Pro Ala	Asp Pro Val Arg Thr Pro Arg Gly Leu		

THIS PAGE BLANK (11/15/2015)

605	610	615	620	
aac acg gcc gcg ccc gtc ctg ggc agg gcc ctg gcg gac gcc gtg gcg				2962
Asn Thr Ala Ala Pro Val Leu Gly Arg Ala Leu Ala Asp Ala Val Ala				
	625	630	635	
gag ctg cgg gcg gcg ggc atc gcg ctg gac gcc ccg ctg ggc gag cac				3020
Glu Leu Arg Ala Ala Gly Ile Ala Leu Asp Ala Pro Leu Gly Glu His				
	640	645	650	
cag ttc gtc gtg cgg aac ggc aag cgg ctc ccg atc ggc ggc ggg acg				3068
Gln Phe Val Val Arg Asn Gly Lys Arg Leu Pro Ile Gly Gly Gly Thr				
	655	660	665	
gag tcg ctg ggc atc tgg aac aag acc gag ccg cag tgg aac gcg gcg				3116
Glu Ser Leu Gly Ile Trp Asn Lys Thr Glu Pro Gln Trp Asn Ala Ala				
	670	675	680	
ggc ggc ggc tat acg gag gtg tcg tcg ggc tcc agc tac atc cag gcg				3164
Gly Gly Gly Tyr Thr Glu Val Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Ile Gln Ala				
685	690	695	700	
gtc ggc tgg gac gac agc cgc tgc ccg gtg gcc cgg acg ctg ctg acg				3212
Val Gly Trp Asp Asp Ser Arg Cys Pro Val Ala Arg Thr Leu Leu Thr				
	705	710	715	
tac tcc cag tcg gag aac ccg aag tca ccg cac tac agc gac cag acc				3260
Tyr Ser Gln Ser Glu Asn Pro Lys Ser Pro His Tyr Ser Asp Gln Thr				
	720	725	730	
agg ctg tac gcg ggt gag cgc tgg gtg acg tcc cgg ttc tgc gag agg				3308
Arg Leu Tyr Ala Gly Glu Arg Trp Val Thr Ser Arg Phe Cys Glu Arg				
	735	740	745	
gac atc gcg cgt tcg ccg gac ctg cgg gtg gtg cgg gtg cac gag cgg				3356
Asp Ile Ala Arg Ser Pro Asp Leu Arg Val Val Arg Val His Glu Arg				

THIS PAGE BLANK (USPTO)

750	755	760	
cgg tag cgcggtg ggcggacggg cccgcccatc cgcggcgaga agggcggtccg			3409
Arg			
765			
cctcggcggg cgcctttctc accgatgtgt cgtgaccgcg ctcccggggg cgtcctcacc			3469
gagccgccga agggcccggc ggccgaaccc gtgaccatgc gtgcgacgca tcacgtctccg			3529
tcggctccgc cctccgcccg cgcgccaggcc agctgcgcgt cgtcagcgg cgggtcgaag			3589
ccttcgggga acagcagcat ccgcggctgc ggccacatgt tctccggtcc gtgttctga			3649
cagtccaggg cgaggagatg cggcccgtcc ccgcaggact cgtgccggta ggggcggtcg			3709
tgccccggc agaaatagcc gaacaccgca cagtggctgt cgcgcccggt tcgggtgaag			3769
ccgggggtgc tgacgatcac ggtcacccgc tctgccggt tgagccgagg gatgggccgg			3829
ggatcacgcc acaacagtcg aggagggagc acacgtctcat ctccccggg gccgagccca			3889
cgggaagggg gagcacggcg ggacgcctcc cgtcggcgtg atcgaccggg ccgtcccgt			3949
cgcgggcggg cctcccggga cccgttgcctc tacagcgggc gctcgaagcc ctcccagtac			4009
ggttcgcgca gccgccgttt gtagagcttg ccgttgggggt cgcggggcat ggcggtgatg			4069
aagtcgaggc tccgggggtcg tttgtagccg gcgagccgct cctcgcagtg ggcgaggatc			4129
gcggcggcga gcgcgggtga cggctcgtgg ccacggcccg gttcgacgac ggcttgacc			4189
tctcgcgcgc ggtcggcgtg ggggatgccg aaggcggcgg cgtccgcgac ggcggggtgg			4249
gtgagcagga ccgactgat ctcggcgggg tagatgttga cccgcgccgc gatgatcatg			4309
tcgatcttgc ggtcgcggag gaagaggtag ccgtcctcgt ccagcacgcc gaggtcacccg			4369
acggtgaaga agtcgccgat gcggttcgtg cgggtcttgg tctcgtcctt gtggtagctg			4429
aagccgccgg tgctcatctt catgtagacg gtgcccagtt cgcctggcgg gaggcggttg			4489
ccgtcgtcgt cgaagacggc cagttcgtg atcgccagg ccttgccgac ggtgccgggc			4549
ttcttcagcc agtcctcggc ggtggcgaac gctccccgc cctcgttggc cgcgtagtac			4609
tctcgaacgc agtccccca ccagtcgatc atggcgcgtt tgacgtggtc ggggcagggg			4669
gctgccccgt ggatggcgtg ccgcatggag gagacgtcgt agcgggacct cacctcgtcg			4729
ggcagcgcga gcagccggtg gaactgggtg gggaccatgt ggggtgtgggt gcagcggtgg			4789

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gcgtcgacga ggccgagcat ctctcgggc gaccagccgt ccatcaggac cagcgggtgg 4849
 ccgatgtgca gggcgggccc cgcgaattgg agtacggcgg tgtggttagag cggcgagcag 4909
 accaggtgga cgttgctgtc gaacggccgg atgccgaaga tgccgaggaa cccgccgagg 4969
 taggtctcct cggggcgttt gccgggcagg gggcgccgga tgccgcgggg gcggccggtg 5029
 gtgcccagagg ttagttcat gaccagccg aggtgcggt tctcaggcgg cgtggcgggg 5089
 tggccttcga ggagttcgcc ccagggcggg cagccgggga ccgtgccgac gccgtagcgg 5149
 tgggtcgagg gcagttccgc ctctcgggc gcggccgtc cgtggccgc gaagcgttcg 5209
 tgggcgatca ggacggggc gccggagtc gcgacgatcc aggcgatctc ggggccgacg 5269
 aggtggtggt tgaccggcac gaggtagaag ccggcctgcg aggcggcgag gtgggcggtg 5329
 aggagttcga cggcgttggg caggacgac gcgaacgcgt cggcctcgc cagtcgggcc 5389
 gcgcgcaggc cgtggaccat gcggttgac tggcggtgca ggcggcccgc gctccactcc 5449
 tcgccgtcgg gggcgatcag gacggtgcgg tgggggtcgg ctgcggcctg ggcccagaaa 5509
 ccgttggggc gctggttcac gtggcactcc ttccggcgat gcggttcacg cgggtgacgg 5569
 cccgttcgaa gccgcgggtc aggtcgtcga cgacggcccg gacgtgcgt tcaactgtca 5629
 tccggccgac gatctgcccg acgggcgtgc cgagcagctc gccgacctg tacttctgga 5689
 tcc 5692

<210> 2

<211> 765

<212> PRT

<213> Streptomyces Sp.

<400> 2

Leu Thr Leu Arg Asn Arg Leu Arg Leu Leu Gly Val Ala Gly Leu Ala

-35

-30

-25

Leu Phe Thr Val Ser Ala Ser Leu Pro Pro Ala Thr Ala Ser Gly Thr

-20

-15

-10

Gln Glu Thr Arg His Pro Ser Gly Ser Gly Leu Ser Ala Val Ile Arg

THIS PAGE BLANK (11SP70)

-5	1	5
Tyr Thr Glu Tyr Gly Ile Pro His Ile Val Ala Glu Asp Tyr Ala Gln		
10	15	20 25
Leu Gly Phe Gly Thr Gly Trp Ala Gln Ala Ala Asp Gln Val Cys Thr		
	30	35 40
Leu Ala Asp Gly Phe Leu Thr Val Arg Gly Glu Arg Ser Arg Phe Phe		
	45	50 55
Gly Pro Asp Ala Ala Thr Asp Tyr Ser Leu Ser Ser Ala Ala Thr Asn		
	60	65 70
Leu Ser Ser Asp Leu Tyr Phe Arg Gly Val Arg Asp Ser Gly Thr Val		
	75	80 85
Glu Lys Leu Leu Lys Glu Pro Ala Pro Ala Gly Pro Ser Arg Asp Val		
	90	95 100 105
Lys Glu Thr Met Arg Gly Phe Ala Ala Gly Tyr Asn Ala Trp Ile Ala		
	110	115 120
Gln Asn Arg Ile Thr Asp Pro Ala Cys Arg Gly Ala Ser Trp Val Arg		
	125	130 135
Pro Val Thr Ala Leu Asp Val Ala Ala Arg Gly Tyr Ala Leu Ala Val		
	140	145 150
Leu Gly Gly Gln Gly Arg Gly Ile Asp Gly Ile Thr Ala Ala Gln Pro		
	155	160 165
Pro Thr Ala Ala Pro Pro Ala Ala Gly Val Thr Pro Glu Glu Ala Ala		
	170	175 180 185
Thr Ala Ala Glu Arg Leu Leu Ser Thr Gln Asn Ala Asp Met Gly Ser		
	190	195 200
Asn Ala Val Ala Phe Asp Gly Ser Thr Thr Val Asn Gly Arg Gly Leu		
	205	210 215

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Leu Leu Gly Asn Pro His Tyr Pro Trp Gln Gly Gly Arg Arg Phe Trp
220 225 230
Gln Ala Gln Gln Thr Ile Pro Gly Glu Leu Asn Val Ser Gly Ala Ser
235 240 245
Leu Leu Gly Ala Thr Thr Ile Ser Ile Gly His Asn Ala Asp Val Ala
250 255 260 265
Trp Ser His Thr Val Ala Thr Gly Val Thr Leu Asn Leu His Gln Leu
270 275 280
Ser Leu Asp Pro Ala Asp Pro Thr Val Tyr Leu Val Asp Gly Lys Arg
285 290 295
Glu Arg Met Thr Gln Arg Thr Val Ser Val Pro Val Lys Gly Gly Ala
300 305 310
Asp Val Thr Arg Thr Gln Trp Trp Thr Arg Tyr Gly Pro Val Ala Thr
315 320 325
Ser Met Gly Ala Gly Leu Pro Leu Pro Trp Thr Ala Ser Thr Ala Tyr
330 335 340 345
Ala Leu Asn Asp Pro Asn Ala Thr Asn Leu Arg Met Ala Asp Thr Gly
350 355 360
Leu Gly Phe Gly Lys Ala Arg Ser Thr Gly Asp Val Glu Arg Ala Leu
365 370 375
His Arg Ser Gln Gly Met Pro Trp Val Asn Thr Ile Ala Ala Asp Arg
380 385 390
Ala Gly Arg Ser Phe Phe Ala Gln Ser Gln Val Leu Pro Arg Ile Thr
395 400 405
Asp Ala Leu Ala Glu Arg Cys Ser Thr Pro Leu Gly Arg Ala Thr Tyr
410 415 420 425
Pro Ala Ser Gly Leu Ala Val Leu Asp Gly Ser Arg Thr Asp Cys Ala

THIS PAGE BLANK (11SPD)

	430	435	440
Leu Gly Ser Asp Pro Asp Ala Val Arg Pro Gly Ile Phe Gly Pro Gly			
	445	450	455
Arg Met Pro Val Leu Lys Asn Gln Pro Tyr Val Glu Asn Ser Asn Asp			
	460	465	470
Ser Ala Trp Leu Thr Asn Ala Glu Arg Pro Leu Thr Gly Tyr Glu Arg			
	475	480	485
Val Phe Gly Thr Ile Ala Thr Pro Arg Ser Met Arg Thr Arg Gly Ala			
490	495	500	505
Ile Glu Asp Val Ala Ser Met Ala Asp Arg Gly Arg Leu Arg Val Gly			
	510	515	520
Asp Leu Gln Arg Gln Gln Phe Ala Asn Arg Ala Pro Ala Gly Asp Leu			
	525	530	535
Ala Ala Ser Glu Ala Ala Lys Trp Cys Ala Ala Leu Pro Gly Gly Thr			
	540	545	550
Ala Val Gly Ser Asp Gly Thr Pro Val Asp Val Ser Ala Ala Cys Arg			
	555	560	565
Val Leu Arg Arg Trp Asp Arg Thr Val Asp Ser Asp Ser Arg Gly Ala			
570	575	580	585
Leu Leu Phe Asp Arg Phe Trp Arg Lys Ala Ser Ser Ala Pro Ala Ala			
	590	595	600
Glu Leu Trp Arg Thr Pro Phe Asp Pro Ala Asp Pro Val Arg Thr Pro			
	605	610	615
Arg Gly Leu Asn Thr Ala Ala Pro Val Leu Gly Arg Ala Leu Ala Asp			
	620	625	630
Ala Val Ala Glu Leu Arg Ala Ala Gly Ile Ala Leu Asp Ala Pro Leu			
635	640	645	

THIS PAGE BLANK (ISPTO)

Gly Glu His Gln Phe Val Val Arg Asn Gly Lys Arg Leu Pro Ile Gly
 650 655 660 665
 Gly Gly Thr Glu Ser Leu Gly Ile Trp Asn Lys Thr Glu Pro Gln Trp
 670 675 680
 Asn Ala Ala Gly Gly Gly Tyr Thr Glu Val Ser Ser Gly Ser Ser Tyr
 685 690 695
 Ile Gln Ala Val Gly Trp Asp Asp Ser Arg Cys Pro Val Ala Arg Thr
 700 705 710
 Leu Leu Thr Tyr Ser Gln Ser Glu Asn Pro Lys Ser Pro His Tyr Ser
 715 720 725
 Asp Gln Thr Arg Leu Tyr Ala Gly Glu Arg Trp Val Thr Ser Arg Phe
 730 735 740 745
 Cys Glu Arg Asp Ile Ala Arg Ser Pro Asp Leu Arg Val Val Arg Val
 750 755 760
 His Glu Arg Arg
 765

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Streptomyces Sp.

<400> 3

Ser Asn Ala Val Ala Phe Asp Gly Ser Thr Thr Val Asn Gly Arg Gly

1

5

10

15

Leu Leu Leu Gly

20

<210> 4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 20

<212> PRT

<213> Streptomyces Sp.

<400> 4

Gly Ser Gly Leu Ser Ala Val Ile Arg Tyr Thr Glu Tyr Gly Ile Pro

1

5

10

15

His Ile Val Ala

20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Streptomyces Sp.

<400> 5

Gly Ser Gly Leu Ser Ala Val Ile Arg Tyr Thr Glu Tyr Gly Ile Pro

1

5

10

15

His His Val Ala

20

<210> 6

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (forward) to amplify the DNA coding N-terminal amino acid sequences of FR901379 acyrase small subunit.

THIS PAGE RI ANK (11SP70)

<400> 6

ctstcsgcsg tsatc

15

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (reverse) to amplify the DNA coding N-terminal amino acid sequences of FR901379 acyrase small subunit.

<400> 7

gtggtgsggg atsc

15

<210> 8

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (forward) to amplify the DNA coding N-terminal amino acid sequences of FR901379 acyrase large subunit.

<400> 8

csgtsgcstt cgacgg

16

<210> 9

<211> 15

THIS PAGE BLANK (ISPTO)

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (reverse) to amplify the DNA coding N-terminal amino acid sequences of FR901379 acyrase large subunit.

<400> 9

sccsagsags agscc

15

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (forward) to amplify the DNA coding sequence between FR901379 acyrase small subunit and large subunit.

<400> 10

atccggtaca cggagtacgg

20

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as PCR primer (reverse) to amplify the DNA coding sequence between FR901379 acyrase small subunit

THIS PAGE BLANK (USPTO)

and large subunit.

<400> 11

cgttcaccgt cgtggagcc

19

<210> 12

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed for use in changing site from EcoR I site to Sac I site.

<400> 12

aattgagctc

10

<210> 13

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 13

caactgcgcg tagtcc

16

<210> 14

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (11SP70)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 14

catgggttcc aacgcg

16

<210> 15

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 15

gctgtcaacc gtctgg

16

<210> 16

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 16

acgcgctgaa cgatcc

16

<210> 17

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE RI ANK 1110070

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 17

cggacctgga cctacc

16

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 18

gtgggtgaac acgatcg

17

<210> 19

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 19

gaccttcage ggcage

16

<210> 20

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (11SP70)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 20

caagtgggtgt gcggcg

16

<210> 21

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 21

gtcgctgggc atctgg

16

<210> 22

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 22

gctgctgacg tactcc

16

<210> 23

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (11SP70)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 23

gtcaaccgca tgggcc

16

<210> 24

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 24

atcgccctgga tcgtcg

16

<210> 25

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 25

cgtcagcgcg atcacc

16

<210> 26

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (ISPTO)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 26

ggtgtacagc agctgc

16

<210> 27

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 27

ctccctcgtc ctgacc

16

<210> 28

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 28

gagttgtgcg cgtagg

16

<210> 29

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (11SP70)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 29

tgacgcttgg ccgtcc

16

<210> 30

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 30

gactacgcgc agttgg

16

<210> 31

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 31

tacaacgcgt ggatcg

16

<210> 32

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE RI ANK (11SDT0)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 32

ggtgatccgg ttctgc

16

<210> 33

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 33

gggtagtgcg ggttgc

16

<210> 34

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 34

ctgcatcagc tcagcc

16

<210> 35

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE RI ANK (11SPFN)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 35

gtccaccact ggggtgc

16

<210> 36

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 36

gaagcggggt aggtgg

16

<210> 37

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 37

ccggtgctga agaacc

16

<210> 38

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 38

ctgccgctga aggtcc

16

<210> 39

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 39

tcgaacggcg tctcc

16

<210> 40

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 40

tggaggacgc cgttcg

16

<210> 41

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (11SP70)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 41

gcctggatgt agctgg

16

<210> 42

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 42

ggacatcgcg cgttcg

16

<210> 43

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 43

cgaacgcgcg atgtcc

16

<210> 44

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 44

ccgtgaccat gcgtgc

16

<210> 45

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 45

gcacgcatgg tcacgg

16

<210> 46

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 46

gaggagacct acctcg

16

<210> 47

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 47

aggtcccgct acgacg

16

<210> 48

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 48

gaccatgcgg ttgacg

16

<210> 49

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 49

cagttccgcc tcgtcg

16

<210> 50

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (11SPFO)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 50

caggtggacg ttgtcg

16

<210> 51

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 51

gtcgctgacg atcacg

16

<210> 52

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 52

gtgatcgta gcgacc

16

<210> 53

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (11SPFO)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 53

ggcggatgatg aagtcg

16

<210> 54

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 54

cgacttcac accgcc

16

<210> 55

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 55

ggcgacttct tcaccg

16

<210> 56

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 56

cggatgaagaa gtcgcc

16

<210> 57

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide designed to act as sequencing primer.

<400> 57

ccagacgggtt gacagc

16

THIS PAGE BLANK (11SP70)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/55, C12N1/21, C12N9/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/55, C12N1/21, C12N9/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO, 97/32975, A1 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD), 12 September, 1997 (12.09.97) & JP, 09-511848, A & EP, 885957, A1 & CN, 1218507, A	1-26
Y	Junji Inokoshi, et al., "Cloning and sequencing of the aculeacin A acylase-encoding gene from Actinoplanes utahensis and expression in Streptomyces lividans", Gene(1992), Vol.119, No.1, pp.29-35	1-26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
10 October, 2000 (10.10.00)

Date of mailing of the international search report
17 October, 2000 (17.10.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N15/55, C12N1/21, C12N9/14		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ C12N15/55, C12N1/21, C12N9/14		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) SwissProt/PIR/GeneSeq, Genebank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSYS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICSTファイブ (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 97/32975, A1, (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CI., LTD), 12.9月. 1997 (12.09.97) &JP, 09-511848, A &EP, 885957, A1 &CN, 1218507, A	1-26
Y	Junji Inokoshi, et al., "Cloning and sequencing of the aculeacin A acylase-encoding gene from <i>Actinoplanes utahensis</i> and expression in <i>Streptomyces lividans</i> ", Gene (1992), Vol. 119, No. 1, p. 29-35	1-26
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 10.10.00	国際調査報告の発送日 17.10.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 引地 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

THIS PAGE BLANK (USPTO)